

## 野兎病皮内反応の実験的研究

著者	過足 博
号	39
発行年	1960
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/17551">http://hdl.handle.net/10097/17551</a>

氏 名	よぎ 過 足 博 士
授 与 学 位	医 学 博 士
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 35 年 3 月 25 日
学位授与の根拠法規	学位規則第 5 条第 1 項
研究科，専攻の名称	東北大学大学院医学研究科 内科学系
学 位 論 文 題 目	野兎病皮内反応の実験的研究

指 導 教 官	東北大学教授	山 形 徹 一
論 文 審 査 委 員	東北大学教授	山 形 徹 一
	東北大学教授	桂 重 次
	東北大学教授	黒 屋 政 彦

# 論文内容要旨

## I. 緒 言

本邦における野兎病皮内反応は、昭和8年、大原(八)により初めて報告され、その後多くの学者により研究され、現在では野兎病菌の分離培養、血清凝集反応と共に本症診断の有力な方法として広く用いられている。

この皮内反応は野兎病に特異的であり、かつ Tuberculin 反応の如き Spätreaktion であると一般に考えられているが、異論がないわけでもなく、また、反応の判定基準に関しても論議がないわけでもない。

本報告では野兎病皮内反応が Tuberculin 型の内応であることを動物実験によつて確かめ、更に反応皮膚を組織学的に検索し、抗原力価検定の可能性について検討を加えた。

## II. 発赤及び硬結の時間的推移

### 1. 実験材料及び方法

使用動物は8羽の家兎及び4匹の海狸で、野兎病菌強毒株名株及び弱毒橋本株の生菌で感作した。

家兎は体重 2.1 kg から 3.3 kg のもので、菌接種後 23~70 日経過、その血清凝集価は 10~320 倍に上昇していた。

海狸は体重 350 g から 420 g のもので、菌接種後 8~40 日経過、その血清凝集価は 10~80 倍に上昇していた。

皮内反应用抗原は豚肝 Hemoglobin 培地に 48 時間培養した野兎病菌株名株 1.0 g を生理的食塩水 1.0 cc に浮遊させたものを厚液とし、更に生理的食塩水で 100, 1,000, 5,000 及び 20,000 倍の稀釈液を作り、70°C 30 分間加熱、0.5% の割に石炭酸を加え、濾紙で濾過したものである。

実験方法は動物の側腹部の毛を刈り取り、前記4種抗原と対照として生理的食塩水に 0.5% の割に石炭酸を加えたものとを 0.1 cc 皮内に注射して、Tuberculin 反応判定の規準に従つて、16時間から 72 時間まで、その発赤及び硬結の推移を観察した。なお、発赤及び硬結の縦横の長さの異なるものはその相加平均をもつて大きさとした。

### 2. 実験成績

比較的発赤及び硬結のよく現われたものを示すと第1表の如くで、家兎においては 48 時間後、

第1表 発赤及び硬結の時間的推移

家 兎													海 狸																								
番号	菌 株	日 数	凝 集 価	発 赤 (mm)					硬 結 (mm)					番号	菌 株	日 数	凝 集 価	発 赤 (mm)					硬 結 (mm)														
				16 時間	24 時間	32 時間	48 時間	72 時間	16 時間	24 時間	32 時間	48 時間	72 時間					16 時間	24 時間	32 時間	48 時間	72 時間	16 時間	24 時間	32 時間	48 時間	72 時間										
52	蛇 名	6640	A	2.0											11	蛇 名	1620	A	3.0																		
			B	8.0	10.0	14.0	16.0	14.5		3.0	3.5	5.0	8.0	5.5				14.0	20.0	12.0	8.0	6.0	8.0	10.0	7.0	6.0	4.5										
			C	4.0	6.0	8.0	10.0	9.0				2.5	3.0	3.0				10.5	13.5	8.0	5.0	4.0	5.0	8.0	5.0	3.0											
			D	4.0	3.5	4.5	7.0	6.0										9.0	10.0	5.5	3.0	3.0	6.5	7.0	3.5	2.0											
			E	3.5	2.0	2.5	3.0	4.0										8.0	7.0	4.0	2.0	2.0	5.0	6.0	3.0												
53	7040	名	A	3.0											12	橋 本	1620	A	3.0																		
			B	10.0	10.0	16.0	20.0	20.0		3.0	4.5	6.0	9.0	8.5				11.0	14.0	10.0	6.0	2.0	5.0	6.0	3.5	2.0											
			C	5.0	6.5	10.0	13.5	14.0				3.0	5.0	7.5				6.0	10.0	11.5	8.0	4.0		3.0	4.5	3.0											
			D	3.0	4.5	7.5	10.0	10.0										8.0	10.0	6.0	3.0		3.0	4.0	2.5												
			E	3.0	3.0	3.5	7.0	7.0				3.0	3.0	3.5				8.0	8.5	5.0	2.0		3.0	3.0	2.0												
54	5910	名	A	3.0											13	蛇 名	4040	A	3.0																		
			B	5.5	9.0	10.0	12.0	10.0		3.0	4.0	5.0	4.0					11.0	14.0	12.5	12.0	10.0	3.0	5.0	4.0	3.0	3.0										
			C	3.0	6.0	6.5	8.0	6.0										10.0	10.0	8.0	8.0	6.0															
			D	3.5	4.0	4.5	5.5	4.0										6.0	7.0	6.0	4.0	3.5															
			E	4.0	3.0	3.0	4.0	3.0										5.0	5.0	4.0	3.5	2.0															
56	5280	名	A	3.0											14	橋 本	4040	A	3.0																		
			B	5.0	6.5	10.0	15.0	12.0		3.5	7.5	8.0	6.0					11.0	14.0	12.0	12.0	10.0	3.0	5.0	5.0	4.0	3.0										
			C	3.5	5.5	6.5	9.5	9.0				4.5	5.0	3.5				8.0	10.0	9.0	8.0	6.0	3.0	3.0	2.0												
			D	4.0	3.5	5.5	7.5	8.0				3.0	3.5	2.0				8.0	8.0	7.0	5.5	3.5															
			E	4.0	3.0	4.0	6.0	6.0				2.0	2.0	2.0				5.0	6.5	6.0	4.0	2.0															

A: 対照, B: 100, C: 1000, D: 5000, E: 20000 倍稀釈抗原

海狸においては 24 時間後に発赤及び硬結は最大に達する。これは 100 倍抗原を使用した時に最も著明であつた。これに反し、対照は 16 時間までは軽度の発赤を認める例もあるが、以後消失し、硬結を生じた例はなかつた。

4種抗原の濃度と、家兎では48時間、海猿では24時間後の発赤及び硬結の大きさとの間の相関係数を求めてみると、発赤については家兎+0.67、海猿+0.60、硬結については家兎+0.46、海猿+0.40で、いずれも有意のものと認められる。従つて、抗原濃度の濃いもの程その発赤及び硬結は大きいと考えられる。

また、100倍抗原について、家兎48時間、海猿24時間後の発赤及び硬結の大きさと血清凝集価、菌接種日数、接種菌株による相違などとの相関も調べたが、有意のものとは認められなかった。

更に、この皮内反応が如何なる性質のものであるかは反応皮膚の病理組織学的検索を必要とするので、次の実験を行つた。

### III. 100倍抗原による病理組織学的検索

#### 1. 実験材料及び方法

使用動物は蛇名株及び橋本株の生菌で感作した2羽の家兎及び4匹の海猿で、皮内反应用抗原は前の実験で最も著明な反応を起した100倍抗原を用いた。実験方法も前回と同様にし、6時間から48時間まで、まず肉眼的所見を観察し、次いで組織学的検索を行つた。剔出した皮膚は10%中性Formalinで固定し、Hematoxylin-Eosin及びVan Gieson染色を試みた。

#### 2. 実験成績

肉眼的には家兎では48時間後に発赤及び硬結は最大に達し、ある例では水疱を形成したが、明らかな壊死を認めたものはなかった。

組織所見は大體血管の反応様式、細胞浸潤並びに膠原線維の態度の三様に分けて観察したのであるが、家兎では6時間後に軽度の毛細管の拡張、充血、偽好酸球の浸潤を認めた。

12時間後では浮腫、皮下小血管の充血、血管及び汗腺周囲、その他散在性に偽好酸球を主体とした細胞浸潤を認めた。膠原線維は表皮に近い所で粗になつてゐる。

24時間後では皮下の浮腫は著明となり、血管及び汗腺周囲の細胞浸潤が強く、固定細胞の軽度の増殖もみられる。

48時間後では以上の変化が更に増強しているが、反応の主体は偽好酸球及び単核細胞を主体とした浸潤細胞の増加で、膠原線維の膨化や、所々に出血もみられる。

海猿の場合の変化もほぼ同様であるが、浸潤細胞は多核白血球が主体をなし、それに好酸球及び単核細胞の浸潤が認められた。

要するに、家兎では48時間、海猿では24時間後に最も著明な変化が見られ、ほぼ肉眼的所見を裏づけている。

これに対して対照では、12時間後位までは肉眼的にも軽度の発赤を認める例もあるが、硬結は認めなかった。組織学的にも軽度の毛細管の拡張、充血、偽好酸球または多核白血球の浸潤を認めるが、その反応は時間と共に弱まり、消褪する像が見られた。

以上の結果は抗原濃度の薄いものを用い、48時間以後の変化も検索する必要があるので、再び次の実験を行つた。

### IV. 20,000倍抗原による病理組織学的検索

#### 1. 実験材料及び方法

使用動物は蛇名株及び橋本株の生菌で感作した4匹の海猿で、皮内反应用抗原は100倍、20,000倍抗原の2種類を用いた。実験方法は前回と同様にし、6時間後から96時間後までを検索した。

#### 2. 実験成績

第2表に示す如く、100倍抗原を用いたものでは前回の実験と同様、肉眼的にも組織学的にも24時間後で最大に達する反応が認められた。

20,000倍抗原を用いたものでも、肉眼的には、発赤は24時間後に最大に達し、以後漸次消失するが、硬結を認めたものはなかった。

組織学的には6時間後では浮腫の所見と散在性に多核白血球、単核細胞の浸潤を認め、毛細管の拡張、充血、軽度の出血、毛細管内皮の軽度の肥大及び増殖が見られた。

12時間後では充血、出血は高度となり、血管及び汗腺周囲に多核白血球、単核細胞の浸潤並

第 2 表 組 織 学 的 所 見

海 猿 番号	接種 回数	抗原 0.1cc	肉 眼 及 び 組 織 学 的 所 見													
			6 時 間		12 時 間		24 時 間		48 時 間		72 時 間		96 時 間			
			充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結	充 血 及 硬 結
21	400g	対照	3×3	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1:100	5×5	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1:20000	4×4	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
11	350g	対照	2×2	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1:100	5×5	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1:20000	6×6	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
12	400g	対照	0	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1:100	8×8	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1:20000	6×6	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
19	450g	対照	3×3	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1:100	10×10	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1:20000	5×5	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
20	480g	対照	4×4	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1:100	5×5	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1:20000	8×8	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±

1. 表において充血、出血及び浸潤細胞の程度を大きく(一)から(++)の5段階に付けた。  
 2. 分数は分母が発赤、分子が硬結の大きさである。

びに膠原線維の膨化を認めるが、100 倍抗原に比して多核白血球の浸潤は軽度である。

24 時間後では浮腫、毛細管の拡張、充血、出血、膠原線維の膨化は更に高度となり、円形細胞、単核細胞、多核白血球を主体とする細胞浸潤、固定細胞の軽度の増殖を認めた。

48 時間後では浮腫、充血、出血、細胞浸潤等は 24 時間に比して弱くなっている。

72 時間後には単核細胞の浸潤が主体で、多核白血球の浸潤は更に弱くなり、固定細胞の増殖、軽度の出血が見られた。

96 時間後では 72 時間後の変化と大差なく、軽度の毛細管内皮の肥大が認められた。

要するに、第 1 図に示す如く、20,000 倍抗原を用いたものでは、やや多核白血球の浸潤が軽度で、単核細胞の浸潤が強い傾向があるが、血管及び膠原線維の反応様式は全く同じであつた。

これに対して、対照では前回の実験と全く同様で、殆んど問題にならなかった。

## V. 総 括 並 び に 考 按

Arthus 型の反応と Tuberculin 型の反応との相違に関して、Tezner は抗原注射後反応が出現するまでの時間的差違がその特徴であると考えた。また、Dienes 及び Mallory は Tuberculin 反応局所の皮膚を組織学的に調べ、炎症の初期から単核細胞が出現し、時の経過と共に多核白血球が現われるが Arthus 型反応との相違点であると考えた。しかし、その後の研究では弱い反応の場合には単核細胞が主として現われるが、Tuberculin 反応に一般的に見られるものでなく、初期には及核白血球が現われ、反応の強さに応じて単核細胞が増加することが確かめられた。

野兎病皮内反応においても肉眼的には抗原注射後数時間から発赤出現し、24 ないし 48 時間後で最高に達し、組織学的にも血管及び膠原線維の反応は Tuberculin 反応に類似し、浸潤細胞も抗原濃度によつて多核白血球と単核細胞の割合が変化し、単核細胞の性格が強くなる点からも極めて Tuberculin 型の皮内反応に類似した反応と考えられる。

Tuberculin の力価試験に関して、梅沢等は D を発赤の直径、P を Tuberculin の力価、 $\alpha$  及び  $\beta$  を常数とすると、 $\sqrt{D} = \alpha + \beta \log P$  の関係が成立することを報告した。

この式が野兎病皮内反応にも適用できるかどうかをみるために、まず抗原力価はある程度抗原濃度に比例すると仮定し、20,000 倍抗原の力価を 1 とすると、5,000 倍、1,000 倍及び 100 倍抗原の力価はそれぞれ 4、20、200 とみなしうる。それで縦軸に発赤の平方根 ( $y = \sqrt{D}$ )、横軸に抗原力価の対数 ( $x = \log P$ ) をとつて図に現わすと、 $y = \alpha + \beta x$  となり、 $x$  の一次式であるから直線になる筈である。すなわち、100 倍抗原と 1,000 倍抗原の間、1,000 倍抗原と 5,000 倍

抗原の間、5,000 倍抗原と 20,000 倍抗原の間及び 100 倍抗原と 20,000 倍抗原の間のそれぞれの直線の方係数はすべて等しくなる筈である。

それ故に、常用対数を使用して、その方向係数を求めてみると、第3表に示す如く、16 時間を除いては観察各期の数値がかなりよく一致しているのが見られる。従つて、ある程度の誤差を

第3表 各時間における方向係数

家 兎	方 向	方 向 係 数					海 獺	方 向 係 数				
		16 時 間	24 時 間	32 時 間	48 時 間	72 時 間		16 時 間	24 時 間	32 時 間	48 時 間	72 時 間
52	a	0.83	0.70	0.91	0.94	0.81	11	0.50	0.80	0.64	0.59	0.45
	b	0.00	0.83	1.01	0.74	0.79		0.34	0.73	0.69	0.72	0.45
	c	0.22	0.76	0.90	0.68	0.75		0.29	0.86	0.58	0.53	0.53
	d	0.42	0.76	0.94	0.77	0.79		0.40	0.79	0.64	0.61	0.45
	e	0.40	0.75	0.92	0.77	0.79		0.40	0.79	0.64	0.62	0.45
53	a	0.93	0.61	0.84	0.80	0.73	12	0.16	0.35	0.33	0.45	1.41
	b	0.72	0.61	0.61	0.73	0.83		0.48	0.33	0.54	0.38	0.00
	c	0.00	0.65	0.67	0.86	0.86		0.00	0.41	0.36	0.53	0.00
	d	0.62	0.62	0.72	0.79	0.79		0.21	0.36	0.40	0.45	0.61
	e	0.65	0.62	0.72	0.79	0.80		0.24	0.35	0.41	0.44	0.61
54	a	0.61	0.55	0.61	0.64	0.71	13	0.16	0.58	0.71	0.64	0.71
	b	-0.20	0.64	0.61	0.69	0.64		1.02	0.74	0.54	0.54	0.83
	c	-0.21	0.45	0.65	0.58	0.45		0.36	0.68	0.75	0.96	0.76
	d	0.15	0.55	0.62	0.64	0.62		0.47	0.65	0.67	0.69	0.76
	e	0.15	0.56	0.62	0.64	0.63		0.51	0.67	0.66	0.67	0.76
56	a	0.37	0.21	0.61	0.79	0.46	14	0.49	0.58	0.46	0.64	0.71
	b	-0.18	0.68	0.29	0.49	0.25		0.00	0.48	0.50	0.69	0.83
	c	0.00	0.23	0.58	0.48	0.47		0.99	0.46	0.33	0.58	0.76
	d	0.10	0.36	0.51	0.62	0.44		0.47	0.52	0.44	0.64	0.76
	e	0.09	0.35	0.49	0.62	0.42		0.47	0.52	0.45	0.64	0.76

Q: 100 倍抗原と 1000 倍抗原間

b: 1000 倍抗原と 5000 倍抗原間

c: 5000 倍抗原と 20000 倍抗原間

d: 100 倍抗原と 20000 倍抗原間

e 最小=乗法による。

許せば、野兎病皮内反応においてもこの式が成立すると考えられる。たゞ、16 時間後で必ずしもこの式が成立するといえないのは、対照でも 16 時間後位までは軽度の発赤が見られる例があるので、非特異性反応がかなり影響したものと考えられる。

要するに、抗原力価検定の問題はあらかじめ標準となるべき抗原を定めておけば、動物実験による比較で、未知の抗原の力価を決定することができるわけである。

また、皮内反応判定基準の問題は抗原の力価を先に定めるか、判定規準を先に定めるかが問題であつて、力価を先に定めるならば、一定力価の抗原を使用して、従来の判定規準を再検討してみなければならないし、判定規準を先に定めるならばそれに合つたような力価の抗原を標準として選べばよいわけである。すなわち、従来の判定基準に従えば、野兎病菌感染者の皮膚に 10mm 以上の発赤を出現させるような力価の抗原を選べばよいわけであるが、一方において、抗原の力価はある範囲内ではその濃度に比例すると考えられるので、副作用を呈しないような濃度のものが要請されるわけである。

また、硬結についても調べてみたが、一定の関係は見出されなかつた。

## VI. 結 論

余は野兎病皮内反応の発現機序を検討するために家兎及び海獺を用いて実験し、次の如き結論を得た。

1) あらかじめ野兎病生菌で感作した家兎及び海獺を用いて、野兎病皮内反応が Tuberculin 型の反応であることを肉眼的及び組織学的に確かめ得た。

2) 反応は家兎においては 48 時間、海獺においては 24 時間後で最高に達する。

3) 抗原濃度と発赤及び硬結の大きさとの間にはある程度の平行関係があり、抗原濃度の濃いもの程その発赤及び硬結は大きい。

4) 組織学的にも家兎では 48 時間後、海獺では 24 時間後に反応が最高に達し、その血管、膠原線維及び浸潤細胞の反応様式は Tuberculin 反応に極めて類似する。

## 審 査 結 果 要 旨

野兎病皮内反応がツベルクリン型の皮内反応であることを動物実験によつて肉眼的及び組織学的に確かめるために次の実験を行い、抗原力価検定の可能性について検討を加えている。

使用動物は野兎病生菌で感作した家兎及び海狸で、皮内反应用抗原は野兎病菌蛭名株 1.0 g を 1.0 cc の生理的食塩水に浮遊されたものを原液とし、さらに 100, 1000, 5000 及び 20000 倍の稀釈液を作り、それぞれ 0.1 cc 皮内に注射して時間的にまず肉眼的所見を観察し、次いで反応部皮膚を組織学的に検索し、次の如き結論を得ている。

すなわち、肉眼的には家兎では 48 時間、海狸では 24 時間で発赤及び硬結は最大に達し、その大きさと抗原濃度との間にはある程度の平行関係を認めている。組織学的にも家兎では 48 時間、海狸では 24 時間で最高に達する真皮の浮腫、膠原線維の膨化、毛細管の拡張、充血、出血、多核白血球及び単核細胞の浸潤が見られ、特に浸潤細胞については抗原濃度により多核白血球と単核細胞の割合が変化し、濃度の薄いものを用いた時には単核性の性格が強くなるのが認められ極めてツベルクリン反応に類似した反応と考えている。また、抗原力価検定の可能性については、あらかじめ標準となる抗原を定めておけば動物実験による比較で未知の抗原の力価を決定しうると考えている。

従つて本論文は学位授与に値するものと判定する。